

PAT-NO: JP411080193A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 11080193 A

TITLE: PENTAPEPTIDE, ITS PRODUCTION AND USE

PUBN-DATE: March 26, 1999

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

SUETSUNA, KUNIO

SAITO, MASANOBU

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

KK SHIRAKO

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP09246807

APPL-DATE: September 11, 1997

INT-CL (IPC): C07K007/06, A61K038/55, C12P021/06

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a hypotensive agent with reduced side-effects.

SOLUTION: The pentapeptide having L-amino acid sequence of H-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OH is useful as a hypotensive agent with reduced side-effects. The figure is the chart of TOF-MS analysis of this pentapeptide. This pentapeptide is obtained by hydrolyzing the protein in laver (a kind of seaweed) and separating the peptide from the hydrolyzed mixture or by synthesizing by the usual liquid or solid phase process.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-80193

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月26日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

C 0 7 K 7/06

A 6 1 K 38/55

C 1 2 P 21/06

// C 0 7 K 123:00

識別記号

Z N A

A D V

F I

C 0 7 K 7/06

C 1 2 P 21/06

A 6 1 K 37/64

Z N A

A D V

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平9-246807

(22) 出願日

平成9年(1997) 9月11日

(71) 出願人 391017986

株式会社白子

東京都江戸川区中葛西7丁目5番9号

(72) 発明者 末綱 邦男

山口県下関市川中本町16-14

(72) 発明者 斉藤 雅信

東京都江戸川区中葛西6-1-17 株式会

社白子研究開発センター内

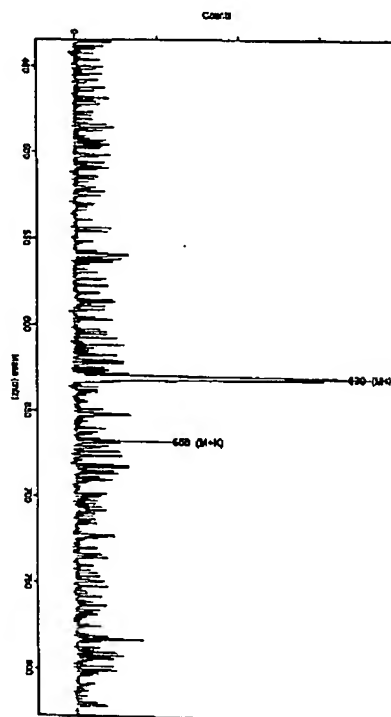
(74) 代理人 弁理士 猪股 祥晃

(54) 【発明の名称】 ペンタペプチド、その製造方法およびその用途

(57) 【要約】

【課題】副作用の少ない血圧降下剤を提供すること。

【解決手段】 $H-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OH$ で示されるL体のアミノ酸配列を有する新規なペンタペプチドは副作用の少ない血圧降下剤として有用である。図はこのペンタペプチドのTOF-MS解析のチャート図である。このペンタペプチドは海苔の蛋白質をペプシン分解し、分解液から分離精製しても得ることができるし、ペプチド合成の常套手段である液相法または固相法で合成しても得ることができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式；H-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHで示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

【請求項2】 海苔をペプシン分解し、分離精製することを特徴とする請求項1記載のペプチドの製造方法。

【請求項3】 次式；H-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHで示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする血圧降下剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、食品、医薬品として有用性を有する新規なペプチドおよびその製造方法に関し、さらに該ペプチドを有効成分とする血圧降下剤に関する。

【0002】

【従来の技術】高血圧は病的に血圧上昇の原因が明らかかなもの（病候性高血圧）と不明なもの（本態性高血圧）とに大別されている。病候性高血圧は原因となる疾患を治癒させることで高血圧を治癒させることができるが、本態性高血圧では原因に対する直接的な治療法は困難である。一方、レニン-アンジオテンシン系（以下、R・A系と略記する。）は、本態性高血圧の重要な要因の一つであると考えられており、ここ10年来、R・A系で中心的な役割を果たしているアンジオテンシン変換酵素（以下ACEと略記する。）の活性を阻害することによってR・A系を調節して本態性高血圧を調節する試みが行われてきた。

【0003】そのようなACE活性阻害を有する物質としては、合成化合物の場合にはL-プロリン誘導体やそれをベースにした化合物が知られており、天然物由来の物質の場合には蛇毒由来のブラジキニン増強因子、ゼラチンのコラゲナーゼ消化物由来の6種類のヘキサペプチド、牛カゼインのトリプシン消化物のペプチドなどが知られている。特に近年は、副作用の点において懸念が残る合成化合物よりも安全性の点で優れている天然物由来、その中でも我々が日常的に摂取している食品から見出されたものが、低毒性で安全性の高い降圧剤となることが期待されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、天然物中に見出されるACE阻害物質は、存在量が僅かで、ペプチドに至ってはその調製方法が困難を極めている。本発明は、かかる状況に対処してなされたもので、天然物とりわけ安全性が高いと思われる食品を材料に副作用の少ないACE阻害物質を探索し、低毒性で安全性の高い降圧剤を提供することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは海苔の蛋白質をペプシンで加水分解した組成物中にACE阻害活性を有する物質があることを見出し、先に特許出願したが（特願平8-332270号）、今回この物質が、H-アラニン（Ala）-リジン（Lys）-チロシン（Tyr）-セリン（Ser）-チロシン（Tyr）-OHのアミノ酸配列を有するペプチドであることをつきとめ、本発明を完成した。

【0006】すなわち本発明は、次式；H-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHで示されるL体のアミノ酸配列のペプチド構造を有する新規なペプチドに関する。また本発明は、海苔をペプシン分解し、分離精製することを特徴とする上記ペプチドの製造方法に関する。さらに本発明は、この新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする血圧降下剤に関する。

【0007】本発明のH-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHよりなるペプチドは文献未載の新規なペプチドであり、海苔の蛋白質をペプシンによって加水分解することによって製造される。また、ペプチド合成の常套手段を適用して合成することによって製造することもできる。

【0008】海苔の蛋白質をペプシンによって加水分解することによって製造する場合には、海苔に所定量のペプシンを加え、30～60℃程度で1～48時間反応を行う。加水分解液中には本発明のペプチド以外に、他のペプチドやペプチド以外の成分も存在しているので、ここから単離する。単離は、加水分解液を遠心分離などの公知の操作で分離した後、抽出、濃縮、乾固などを適用した後、種々の吸着剤に対する吸着親和性の差、種々の溶剤に対する溶解度の差、分子の大きさに基づく溶出速度の差、溶液からの透析性あるいは透析速度の差などを利用する手段を適用して目的物を単離するのが好ましい。これらの方法は必要に応じて単独に用いられ、あるいは任意の順序に組み合わせ、また、反復して適用される。

【0009】本発明のペプチドを合成法によって製造する場合は、ペプチド合成に通常用いられる方法、即ち液相法または固相法でペプチド結合の任意の位置で二分される2種のフラグメントの一方に、相当する反応性カルボキシル基を有する材料と、他方のフラグメントに相当する反応性アミノ基を有する材料とをカルボジイミド法、活性エステル法等を用いて縮合させ、生成する縮合物が保護基を有する場合、その保護基を除去することによって製造し得る。本発明のペプチドはACE阻害活性を有し、副作用の少ない血圧降下剤として有用である。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれにより何等制限さ

れるものではない。

(製造例1)

#### 海苔のペプチン分解によるペプチドH-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHの調製

【0011】乾海苔を高速粉砕器にて35meshに微粉化したもの50gを、HCl-KCl緩衝液(PH=2.0)950mlに混濁し、ペプチン(天野製薬製)2gを加え、攪拌下50℃で24時間反応させた。得られた分解液をNaOHの1N溶液にて中和し、14000rpmで20分間遠心分離し、上清をグラスフィルターにて濾過した。その後、直ちに沸騰浴中に20分間保持して酵素を失活させ海苔蛋白質の分解物を得た。

【0012】次に、得られた海苔蛋白分解物を、HClで置換したバイオラッド社製Dowex-50(H<sup>+</sup>)カラム(φ4.5cm×43cm)に負荷し、5リットルの蒸留水で洗浄後、2Nアンモニア水にて吸着しているペプチドを溶出し、エバポレーションによりアンモニアを除去後、凍結乾燥を行い、海苔由来ペプチド混合物を得た。

【0013】次に、得られたペプチド混合物を0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解して、ODSカラムCAPCELLPAK UG-120(φ10mm×250mm)(株)資生堂製)に負荷し、0.05%トリフルオロ酢酸を含む25%アセトニトリルを用いたリニアグラジエントHPLCにより流速4ml/分にて分析し、52.8~53.4分のピークを分取し、凍結乾燥後、プロテインシークエンサーによりアミノ酸配列および塩酸加水分解によるアミノ酸組成を分析した。その結果、H-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHの構造を示すペプチドを得た。

【0014】(製造例2)

#### 固相法によるペプチドH-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHの調製

【0015】アブライドバイオシステム社製のペプチド自動合成装置を用いた固相法によって当該ペプチドを合成した。固相単体としては、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体(ポリスチレン樹脂)をクロロメチル化した樹脂を使用した。まず、当該ペプチドのアミノ酸配列に従って、常法どおり、そのC末端のチロシンからクロロメチル樹脂に反応させ、ペプチド結合樹脂を得た。このときのアミノ酸は、t-ブトキシカルボニル(以下「t-Boc」とする)基で保護されたt-Bocアミノ酸を使用した。

【0016】次にこのペプチド結合樹脂をエタンジオールとチオアニソールからなる混合液に懸濁し、室温で10分間攪拌後、氷冷下でトリフルオロ酢酸を加え、さらに10分間攪拌した。この混合液にトリフルオロメタンスルホン酸を滴下し、室温で30分間攪拌した後、無水エーテルを加えてその生成物を沈殿させて分離し、その沈殿物を無水エーテルで数回洗浄した後、減圧下で乾燥

した。このようにして得られた未精製の合成ペプチドは蒸留水に溶解した後、逆相系のカラムC18を用いて、0.1%トリフルオロ酢酸を含む50%アセトニトリルを用いたリニアグラジエント法HPLCにて精製を試みた。紫外部波長220nmで検出し、最大の吸収を示した溶出面分を分取し、凍結乾燥により目的とするペプチドの合成物を得た。得られたペプチドについてのTOF-MSの結果を図1に示す。

【0017】(試験例1)

#### ACE阻害活性の測定

試験管に所定濃度に溶解した製造例2のH-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHの構造を示すペプチド50μlを入れ、次いで酵素基質としてL-ヒプリルヒスチジルロイシン(ペプチド研究所製)を12.5mMの濃度になるように1.0M塩化ナトリウムを含む硼酸緩衝液(PH=8.3)に溶解し、これを上記試験管に100μl添加し、最後に25mU/mlになるように蒸留水に溶かしたACE溶液を100μl加えて37℃にて1時間反応させた。その後、HClの0.5N溶液250μlを加えて反応を停止し、5分間放置後、酢酸エチル1.5mlを管壁に伝わらせながら加え、激しく攪拌後、遠心分離(3000rpm, 10分間)を行い、上層(酢酸エチル層)0.5mlを採取し、乾燥器にて120℃, 30分間で酢酸エチルを蒸発させた後、生成した馬尿酸を1.0M塩化ナトリウム3mlにて溶解し、228nmにて吸光度を測定した。

【0018】サンプルでの吸光度をEs、サンプルの代わりに蒸留水を加えた時の値をEc、予め反応停止液を加えて反応させた時の値をEbとして、阻害率(%) =  $\{(Ec - Es) / (Ec - Eb)\} \times 100$ で表した。ACE阻害の活性IC<sub>50</sub>値は、ACEを50%阻害するために必要なサンプル濃度である。その結果、本ペプチドのIC<sub>50</sub>は $1.2 \times 10^{-6}$ Mであった。

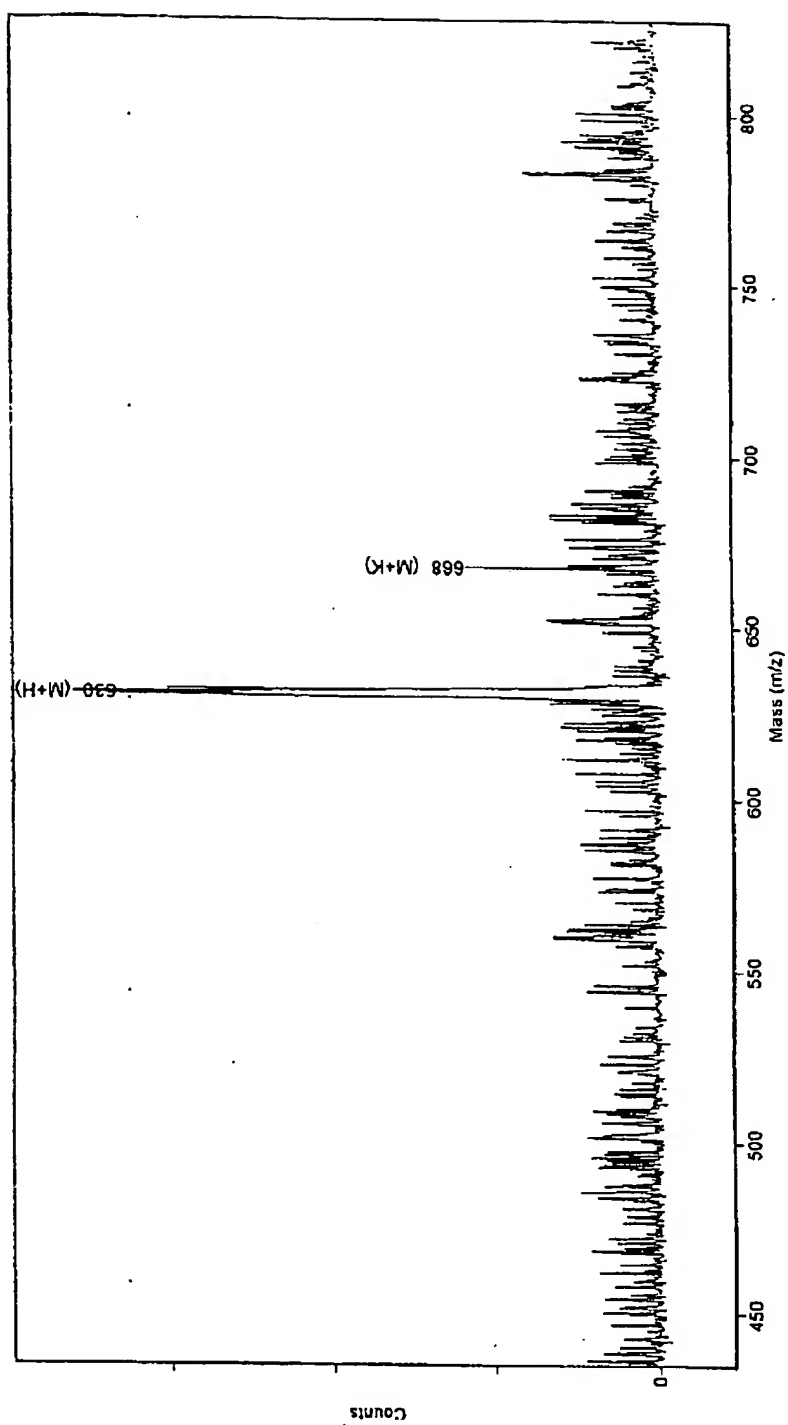
【0019】(試験例2)

#### ラットへの投与時の降圧効果

日本エスエルシー(株)より15週齢雄性高血圧自然症ラット(SHR)を購入し、2週間の予備飼育後、収縮期血圧が190mmHg以上の動物6匹を1群として用い、製造例2のH-Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr-OHの構造を示すペプチドをCMC0.5%水溶液を用いて懸濁し、300(mg/kg p.o.)にて金属製ゾンデを用いて経口投与した。

【0020】血圧は非観血的尾動脈血圧測定装置(室町機械製、MK-1030型)を用い、tail-cuff法により、投与前、投与後1時間、2時間、4時間、6時間、8時間のSHR尾動脈の収縮期血圧(SBP)、平均血圧(MBP)、拡張期血圧(DBP)、脈拍の測定を測定時間毎に5回行い、得られた測定値の最高値と最低値を棄却し、3回の平均値をもって各時間の測定値とした。その結果、投与4時間後に有意に収縮期

【図1】



血圧のみの低下が確認された。また、脈拍数においても \*【0021】  
2時間後に低下が認められ、その後も低い傾向を示し 【表1】  
た。表1にこれらの結果を示す。 \*

	投与前	1 h r	2 h r	4 h r	6 h r	8 h r
収縮期 血圧	203.2 ±9.9	192.7 ±39.2	193.3 ±28.9	183.8* ±13.8	188.0 ±20.2	187.8 ±16.5
平 均 血圧	169.7 ±13.4	151.3 ±29.9	147.5 ±30.8	145.8 ±21.4	145.7 ±25.8	142.2 ±19.7
拡張期 血圧	153.2 ±21.0	130.5 ±31.7	124.3 ±38.3	127.2 ±28.2	125.0 ±29.6	119.3 ±23.0
脈 拍	400.2 ±30.9	331.0* ±54.2	312.7** ±32.1	337.2 ±44.1	352.7 ±35.8	334.3* ±28.7

mean ± S. D

statistically significant difference from control group

\* P < 0.05      \*\* P < 0.01

【0022】通常、降圧薬を投与すると、血圧の低下に伴って頻脈が誘発される副作用が認められる場合があるが、本ペプチドにおいてはそのような副作用の少ないことが認められた。

【0023】(製剤例)

抗高血圧用輸液の調製

製造例2で調製した本ペプチド50mg、塩化ナトリウム9g、クロロブタノール5g、炭酸水素ナトリウム1gを、蒸留水1000mlに溶解し、これを2本の点滴ビンに分注し、抗高血圧用輸液を得た。

※30

※【0024】

【発明の効果】以上説明したように、本発明のペプチドはACE阻害活性を有し、また、それに由来する血圧低下作用を示すので、血圧降下剤として有用である。また、このペプチドは、海苔の酵素分解や合成法によっても製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のペプチドのTOF-MS解析のチャート図。